

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Nela Kohoutová

STANOVENÍ AMINOKYSELIN NA ELEKTRODÁCH NA BÁZI MĚDI

Determination of amino acids on copper-based electrodes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Dejmková, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Bc. Nela Kohoutová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce, RNDr. Haně Dejmkové, Ph.D., za její odbornou pomoc a cenné rady. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu, jak během sepisování této práce, tak během celého studia.

Abstrakt

V této práci bylo studováno chování elektrochemického detektoru pro průtoková měření, vhodného ke stanovení nederivatizovaných aminokyselin s použitím nového typu elektrody z tenkých měděných drátků. Jako modelová aminokyselina byl použit tyrosin.

Podařilo se nalézt vhodný způsob pro aktivaci měděné elektrody, kterým bylo dosaženo stabilní základní linie s co možná nejnižším pozadím, a také bylo zjištěno, že optimální hodnotou potenciálu pro stanovení tyrosinu s využitím tohoto detektoru je 0,3 V.

Ukázalo se, že hmotnost použité měděné elektrody nemá na velikost signálu tyrosinu vliv, nicméně porovnáním teoretické a reálné hodnoty prošlého náboje bylo zjištěno, že reakce na elektrodě neprobíhá kvantitativně, a tudíž se jedná o detektor ampérometrický, nikoli coulometrický.

Nakonec byla ověřena linearita proudové odezvy detektoru v závislosti na koncentraci tyrosinu. Proměřen byl koncentrační rozsah od $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Mez detekce byla $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Abstract

In this Thesis, electrochemical behavior of the flow detector made of the thin copper wires was studied. This detector is suitable for the determination of amino acids without preliminary derivatization; in this case, tyrosine was used as the model compound.

Suitable activation procedure for the copper electrode was found, which assured the stable baseline with lowest possible background current. It was also found that the optimum detection potential for tyrosine determination is 0.3 V.

It was shown that the mass of the copper electrode does not influence the response of the electrode. Nevertheless, according to the comparison of the theoretical and found charge, the electrochemical reaction is not quantitative. Therefore, the electrode works in amperometric and not in coulometric mode.

Finally, linearity of the current response in dependence on the tyrosine concentration was confirmed in the concentration range from $1.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ to $2.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Limit of detection was $1.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ and limit of quantification was $5.1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Klíčová slova

stanovení aminokyselin

tyrosin

měděná elektroda

amperometrický detektor

Key words

amino acids determination

tyrosine

copper electrode

amperometric detector

Obsah

1. Teoretická část.....	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Aminokyseliny	10
1.3 Separace a detekce aminokyselin neelektrochemickými metodami	12
1.3.1 Detekce derivatizovaných aminokyselin v kapalinové chromatografii....	12
1.3.2 Přímá detekce aminokyselin v kapalinové chromatografii.....	14
1.4 Elektrochemická detekce aminokyselin.....	15
2. Experimentální část.....	17
2.1 Použitá aparatura.....	17
2.1.1 Průtoková měření.....	17
2.1.2 Výroba elektrody z měděných drátků.....	17
2.1.3 Další přístroje	19
2.2 Příprava použitých chemikálií	20
2.3 Zpracování dat	20
3. Výsledky a diskuze	21
3.1 Zkouška nastavení a podmínek měření.....	21
3.1.1 Aktivace měděné elektrody v koncentrované HNO ₃	22
3.1.2 Změna kolony a pH mobilní fáze	23
3.2 Vliv velikosti elektrody na výšku píku	24
3.3 Opakovatelnost	29
3.3.1 Opakovatelnost s meziaktivací	30
3.3.2 Opakovatelnost při nižší koncentraci	32
3.4 Koncentrační závislost tyrosinu	33
4. Závěr.....	37
5. Literatura.....	39

Seznam použitých zkratek

ACQ	6-aminochinolyl-carbamoyl
AK	aminokyseliny
c	molární koncentrace [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
E	potenciál [V]
ED	elektrochemická detekce (Electrochemical Detection)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ESP	elektrosprej (ElectroSPray)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (High-Performance Thin-Layer Chromatography)
h	výška píku [μA]
I	proud pozadí [μA]
IEC	iontově výměnná chromatografie. (Ion Exchange Chromatography)
ISP	iontový sprej (IonSPray)
$L_{1,2}$	interval spolehlivosti
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LOD	mez detekce (Limit Of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit Of Quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
n	počet měření
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
OPA	o-ftalaldehyd
p.a.	pro analýzu

pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
pI	isoelektrický bod
PITC	fenylisothiokyanát
pK_a	kyselá disociační konstanta
R	korelační koeficient
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (Reverse Phase-High-Performance Liquid Chromatography)
RSD	relativní směrodatná odchylka
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography)
UV-Vis	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (UltraViolet-Visible)

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem této práce je prostudovat chování elektrochemického detektoru z tenkých měděných drátků při stanovení nederivatizovaných aminokyselin v průtokovém uspořádání. Součástí tohoto postupu je optimalizace podmínek měření, jako složení mobilní fáze a průtoková rychlost, a dále ověření základních parametrů vyvinuté metody – opakovatelnosti, linearity proudové odezvy a meze detekce a stanovitelnosti.

1.2 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AK) jsou významnou skupinou biomolekul. Ze strukturního hlediska jsou to substituční deriváty karboxylových kyselin, jež na svém uhlíkovém řetězci nesou jednu nebo více aminoskupin. Poloha aminové skupiny je vzhledem k uhlíku skupiny karboxylové označována písmenem řecké abecedy.

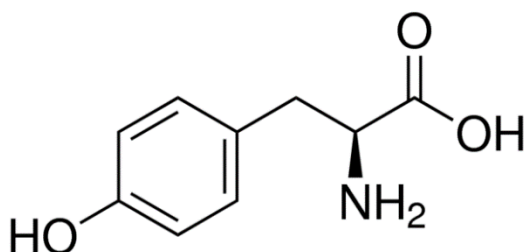
Z hlediska biochemie jsou nejvýznamnější skupinou aminokyseliny proteinogenní, tedy ty, které jsou součástí proteinů. Běžně se v proteinech vyskytuje 20 aminokyselin. Všechny mají aminoskupinu na druhém uhlíku, tedy v poloze α . Tento uhlík je (kromě glycinu) stereogenním centrem. AK jsou tedy chirálními molekulami, a mohou se vyskytovat v konfiguraci D nebo L. V proteinech však zaujímají vždy konfiguraci L.

Vzhledem k přítomnosti dvou disociovatelných skupin – karboxylu a aminoskupiny, jsou všechny AK látky amfoterní povahy a v závislosti na pH roztoku se mohou chovat jako slabé kyseliny nebo zásady [1]. Jednotlivé disociační stupně jsou charakterizovány disociačními konstantami pK_a . Hodnota pH, při níž je aminokyselina ve formě amfiontu (nulový volný náboj) se nazývá isoelektrický bod a je značena pI . Při této hodnotě se amfion nepohybuje ve stejnosměrném elektrickém poli. Isoelektrický bod aminokyseliny je ovlivněn případnou přítomností další disociovatelné skupiny v jejím postranním řetězci [2, 3].

Dle povahy postranního řetězce můžeme proteinogenní aminokyseliny dělit do několika skupin. První skupinou jsou AK nepolární, mezi které patří alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, methionin, fenylalanin a tryptofan. Druhou skupinou jsou AK

polární nenabitě – glycin, serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin a glutamin. Třetí skupinu představují AK polární se záporně nabitým postranním řetězcem – asparagová a glutamová kyselina a čtvrtou potom AK polární s kladně nabitým postranním řetězcem – lysin, arginin a histidin [1].

Pro tuto práci byl jako modelová aminokyselina využit tyrosin. Tyrosin je aminokyselina s polárním postranním řetězcem. Jeho strukturu lze vidět na obr. 1.1. Na rozdíl od ostatních proteinogenních aminokyselin je jen omezeně rozpustný ve vodě, jeho rozpustnost je 0,479 g/l při 25 °C. Dobře se rozpouští v kyselině chlorovodíkové. K dostání je ve formě jemných bílých krystalů bílé barvy [4]. Díky přítomnosti aromatického kruhu tyrosin jako jedna z mála proteinogenních aminokyselin absorbuje v UV oblasti.



Obr. 1.1 Strukturní vzorec L-tyrosinu

V lidském organismu tyrosin slouží, mimo jiné, jako prekurzor hormonu štítné žlázy thyroxinu, kožního pigmentu melaninu nebo catecholaminů – adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. Tyrosin se řadí mezi neesenciální aminokyseliny [5]. Organismus si ho běžně dokáže syntetizovat hydroxylací fenylalaninu [6]. Esenciálním se stává u osob trpících dědičným metabolickým onemocněním zvaným fenylketonurie, při kterém se fenylalanin na tyrosin nepřeměňuje. Osoby s tímto onemocněním musí dodržovat přísnou dietu s omezeným příjmem fenylalaninu a současně doplňovat tyrosin [5]. Fatální může být neléčené fenylketonurie především u dětí, jelikož přebytek fenylalaninu má toxické účinky na vývoj mozku. Z toho důvodu je v České republice test na fenylketonurii součástí novorozeneckého screeningu.

1.3 Separace a detekce aminokyselin neelektrochemickými metodami

Stanovování aminokyselin je významnou oblastí analytické chemie. Aminokyseliny jsou analyzovány v nejrůznějších vzorcích, mohou to být tělní tekutiny, léky nebo potraviny a mnoho dalších. Jestliže se ve vzorku nachází více aminokyselin, popřípadě má složitější matici, je třeba analyty nejprve separovat. Separace aminokyselin je možná pomocí různých technik. Mezi nejvyužívanější patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) [7], iontově výměnná chromatografie (IEC) [8], kapilární elektroforéza (CE) [9, 10] plynová chromatografie (GC) [11] nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC) a vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie (HPTLC) [12, 13]. Problém při stanovování aminokyselin nastává v detekci.

1.3.1 Detekce derivatizovaných aminokyselin v kapalinové chromatografii

Často využívaným detektorem v kapalinové chromatografii je UV-Vis spektrometr. Detekce aminokyselin s použitím tohoto detektoru ovšem obvykle vyžaduje derivatizaci. Většina proteinogenních aminokyselin neobsahuje ve své struktuře vhodný chromofor, který by detekci umožňoval. Bez předchozí derivatizace v UV oblasti absorbují pouze ty AK, které mají ve svém postranním řetězci aromatický kruh – fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan. Obdobná je situace s fluorescenčním emisním detektorem.

Derivatizace aminokyselin probíhá nejčastěji jako předkolonová, kdy k derivatizaci dochází ještě před separací, nebo pokolonová. Jednou z nejstarších, avšak stále využívaných metod, je pokolonová derivatizace ninhydrinem. Reakcí ninhydrinu s α -aminokyselinou vzniká barevný produkt, který může být detekován UV-Vis spektrometrem. Nevýhodou této metody je, že ninhydrin reaguje nejen s AK, ale i s dalšími analyty s aminovou funkční skupinou, jako jsou aminoalkoholy nebo primární a sekundární aminy [14, 15].

Další variantou pokolonové derivatizace je reakce AK s měďnatými ionty. Schopnost mědi vytvářet donor-akceptorové vazby s aminokyselinami je známa z biologických procesů. Jelikož volný měďnatý ion je toxický již při nízkých koncentracích, musely se organismy přizpůsobit tím, že přenos měďnatých iontů uvnitř organismu probíhá pouze ve vazbě tohoto iontu na proteinový komplex [16]. Toho lze využít i při detekci AK. Komplexy vzniklé reakcí aminokyselin s Cu^{2+} absorbují v oblasti 230-250 nm. Tímto způsobem bylo detekováno všech 20 proteinogenních aminokyselin [17]. Měďnaté ionty je možno přidat také přímo do mobilní fáze [18], tohoto způsobu se ale využívalo spíše v minulosti.

Přehled některých dalších derivatizačních činidel, která umožňují detekci aminokyselin UV-Vis nebo fluorescenčním detektorem je uveden v tabulce 1.1.

Tab. 1.1 Derivatizační činidla umožňující detekci aminokyselin UV-Vis nebo fluorescenčním detektorem

metoda stanovení	činidlo	detekce	zdroj
RP-HPLC	dansyl-chlorid, dabsyl-chlorid	fluorescenční	[19]
RP-HPLC	dabsyl-chlorid	UV-Vis	[20]
RP-HPLC	fenylisothiokyanát (PITC)	UV-Vis	[21]
RP-HPLC	o-ftalaldehyd (OPA)	fluorescenční	[22]
IEC	6-aminochinolyl-carbamoyl (ACQ)	fluorescenční	[23]

1.3.2 Přímá detekce aminokyselin v kapalinové chromatografii

Výhodami přímé detekce aminokyselin, bez provedení derivatizace, jsou bezesporu flexibilita, jednoduchost a přesnost, ale také předcházení problémům, které s sebou derivatizační reakce nesou, jako je snížená opakovatelnost, nestabilita derivátů nebo možnost vedlejších reakcí. Dále je také zkrácena doba přípravy vzorků [24].

Jednou z možností je použití detektoru ELSD, neboli Evaporative Light Scattering Detector. Je to univerzální detektor s možností využití gradientové eluce. Při použití tohoto detektoru se využívá principu, kdy analyt je méně těkavý než rozpouštědlo, přičemž kapičky zmlženého solutu procházejí komůrkou se zdrojem záření, kde dochází k rozptylu světla v závislosti na velikosti částic solutu. Odezva fotodetektoru následně odpovídá hmotnosti solutu. Tímto způsobem byly ve spojení s IEC s porézní grafitovou stacionární fází detekovány všechny proteinogenní aminokyseliny [25].

Chceme-li určit také strukturu detekovaných aminokyselin, je vhodné použít detektor ELSD ve spojení s nukleární magnetickou rezonancí (NMR) [26].

Uplatnění v přímé detekci aminokyselin má také hmotnostní spektrometr (MS). Ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC) byla detekováno 20 proteinogenních AK, a to v uspořádání s jednoduchou hmotnostní detekcí s ionizací elektrosprejem (LC-ESP-MS) [27] nebo s tandemovou hmotnostní detekcí s ionizací iontovým sprejem (LC-ISP-MS/MS) [28].

Další možností pro detekci nederivatizovaných aminokyselin je elektrochemická detekce (ED), která bude podrobněji popsána dále.

1.4 Elektrochemická detekce aminokyselin

Elektrochemická detekce aminokyselin bývá instrumentačně méně náročná než předchozí uvedené metody. Využívány jsou různé elektrochemické techniky – cyklická voltametrie, amperometrie, potenciometrie a další [29]. Jako pracovní bývají používány kovové elektrody, jejichž pořizovací cena však může být poměrně vysoká, vzhledem k tomu, že se často jedná o kovy jako zlato [30] nebo platina [31].

Zajímavou možností pro elektrochemickou detekci aminokyselin je využití mědi. Tento kov je finančně dostupný a jak již bylo řečeno, měďnaté ionty vytvářejí s aminokyselinami velmi pevné komplexy. V první práci zabývající se touto problematikou byly měďnaté ionty přidávány do roztoku až po separaci na koloně, přičemž pokles koncentrace Cu^{2+} byl sledován potenciometricky s Cu^{2+} -iontově selektivní elektrodou [32]. Tímto způsobem však docházelo k rozšiřování píků; problém byl vyřešen použitím detektorů s měděnou pracovní elektrodou.

Proudová odpověď takového detektoru je z velké části závislá na kinetice komplexotvorné reakce mezi Cu^{2+} a aminokyselinou, a dále také na stabilitě vzniklého komplexu [33]. Na povrchu měděné elektrody musí být vytvořena vrstva oxidů obsahující měďnaté ionty; ty vznikají v závislosti na pH elektrolytu a vkládaném potenciálu. Ve slabě kyselém a zásaditém prostředí dochází k rychlému pokrytí měděné elektrody těmito oxidy, případně hydroxidy [34, 35]. Při hodnotách pH 3-4 dochází spíše k tvorbě nerozpustného oxidu měďného, a to neohledě na vložený potenciál. Je-li pH v rozmezí 6-11, dochází také k pokrytí elektrody vrstvou nerozpustného oxidu měďného, avšak se zvyšujícím s potenciálem vznikají ionty Cu^{2+} , které mohou touto vrstvou difundovat. Komplexotvorné reakce s aminokyselinami dále urychlují oxidaci povrchu elektrody a následný nárůst anodického proudu je úměrný koncentraci AK. Obvyklý průběh komplexační reakce je znázorněn rovnicí (1), ze které je zjevné, že měďnaté ionty reagují s aminokyselinami v poměru 1:2 [35, 36].



Studován byl také vliv různých druhů pufrů na kinetiku vzniku komplexu. Ta je velmi rychlá při použití fosfátového nebo uhličitanového pufru, borátový pufr ji naopak zpomaluje [36]. Dalším faktorem, který může snížit rychlost komplexotvorné reakce, je koncentrace organických rozpouštědel, neměla by být vyšší než 10 %. Experimentálně bylo také prokázáno, že pro zvýšení citlivosti detekce je vhodné používat spíše nižší průtokovou rychlost (do $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) [37] a co nejnižší koncentraci pufru [38].

Studovány byly vlastnosti a chování různých typů měděných pracovních elektrod, například na bázi měděného drátku [39], tubulární měděná elektroda [40], disková rotační [36] nebo mikrocylindrická [41].

Pro stanovení aminokyselin detektorem s měděnou pracovní elektrodou se tedy nejčastěji používá fosfátový pufr o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8, které je vhodným kompromisem pro hladký průběh komplexační reakce a současně je šetrné ke kolonám na bázi silikagelu. Průtoková rychlost bývá nastavena do $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a detekční potenciál asi 0,1 až 0,15 V [37].

Podobné komplexační vlastnosti jako měď mají i další kovy, například rtuť, kobalt nebo nikl. Jako elektrodový materiál jsou však z různých důvodů méně výhodné. Kobalt a nikl mají oproti mědi mnohem složitější elektrodové reakce a v případě rtuti vznikají volné ionty, které jsou rychle transportovány směrem od elektrod [42].

2. Experimentální část

2.1 Použitá aparatura

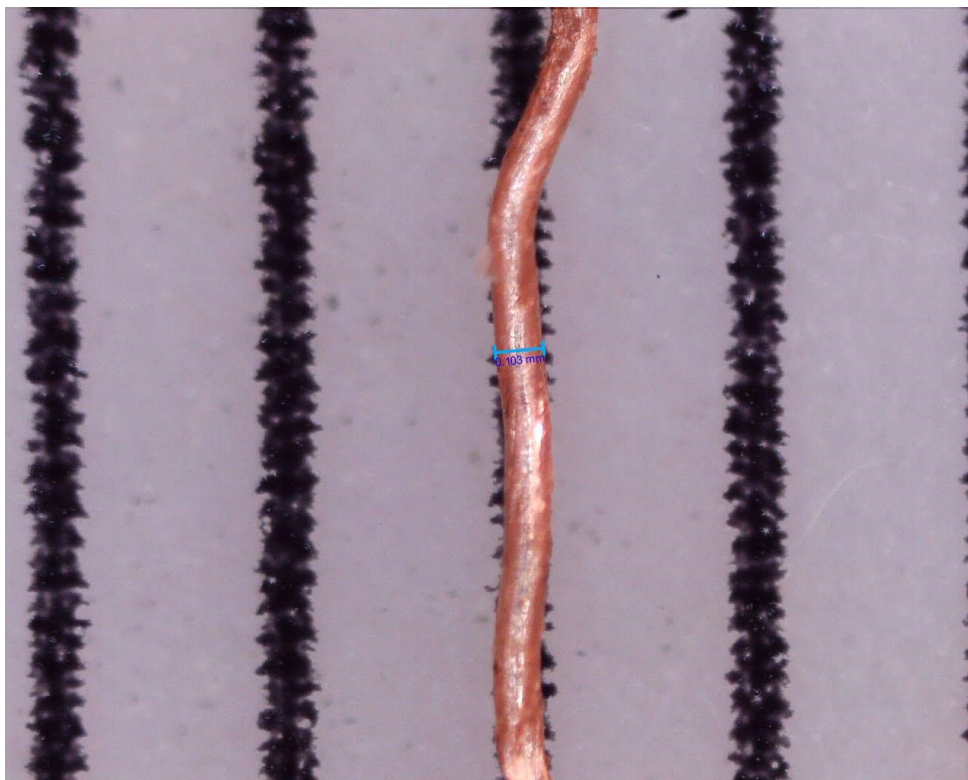
2.1.1 Průtoková měření

Měření byla provedena na sestavě skládající se z degaseru DG 3014 (Ecom, ČR), gradientová pumpa Beta 10 (Ecom, ČR) a šesticestného dávkovacího ventilu (Ecom, ČR) se smyčkou o objemu 20 μl , dále byly použity kolony Purospher® RP-18, $125 \times 4 \text{ mm}$, 5 μm (Merck, DE) a Gemini® C-18, $150 \times 4,6 \text{ mm}$, 5 μm (Phenomenex, USA).

Zapojeny byly dva detektory – UV/VIS Sapphire (Ecom, ČR) a ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, ČR) pracující v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla elektroda z měděných drátků, jako referenční byla použita argentchloridová elektroda v roztoku chloridu draselného o koncentraci $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (Monokrystaly Trutnov, ČR) a jako pomocná platinová elektroda (Monokrystaly Trutnov, ČR). Vše bylo ovládáno softwarem Clarity.

2.1.2 Výroba elektrody z měděných drátků

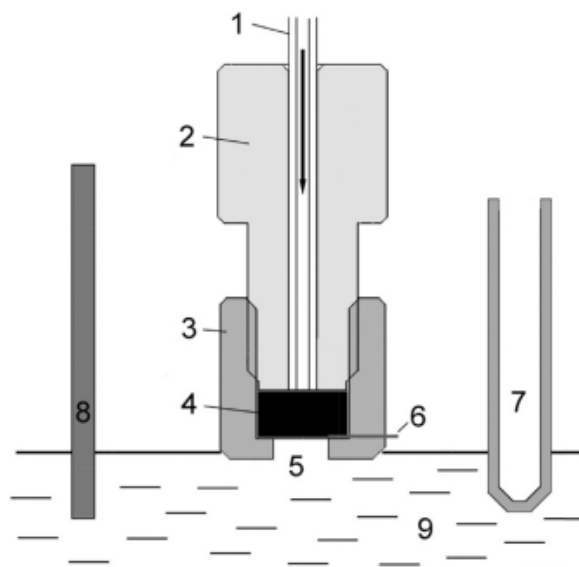
Svazek tenkých měděných drátků (ProsKit, TW), každý o průměru 0,1 mm (obr. 2.1), byl ponořen do zředěné kyseliny dusičné o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po očištění povrchu drátků byl svazek vyjmut, opláchnut deionizovanou vodou a osušen. Osušený svazek byl několikrát přeložen, zvážen na analytických vahách a vložen do elektrodového těla s platinovým elektrickým kontaktem. Vzhled elektrody je možno vidět na obrázku 2.2. Ze známé hmotnosti vyrobené elektrody, hustoty mědi a průměru jednotlivých drátků ve svazku byl vždy vypočten přibližný povrch elektrody. Takto vyrobená elektroda byla připojena jakožto pracovní elektroda k detektoru viz obr. 2.3.



Obr. 2.1 Snímek jednoho z měděných drátků pořízený digitálním mikroskopem



Obr. 2.2 Snímek připravené elektrody z měděných drátků pořízený digitálním mikroskopem



Obr. 2.3 Schéma detektoru. 1 – přívodní kapilára; 2 – plochá ferule se závitem; 3 – tělo elektrody; 4 – elektroda z měděných drátků; 5 – výstup; 6 – platinový elektrický kontakt; 7 – referenční elektroda; 8 – pomocná elektroda; 9 – mobilní fáze v přepadové nádobě

2.1.3 Další přístroje

- pH meter 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou (Jenway, UK)
- Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)
- ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)
- spektrofotometr Specord 210 PLUS (Analytik Jena, DE)
- analytické váhy Sartorius 2004 MP (Sartalex, ČR)
- předvážky EW600-2M (Kern, DE)
- zařízení na úpravu vody Millipore system Symplica UV (Millipore, USA)
- digitální mikroskop Smart 5MP PRO (Delta optical, PL)

2.2 Příprava použitých chemikálií

Zásobní roztok L-tyrosinu ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven odvážením přesného množství látky na analytických vahách a následným rozpuštěním v kyselině chlorovodíkové (35% p.a., Penta Praha) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Úplného rozpuštění látky bylo dosaženo použitím ultrazvukové čističky. Připravený roztok byl uchováván v chladničce.

Kyselá složka fosfátového pufru byla připravena odvážením přesného množství dihydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema Neratovice, ČR), které bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky a doplněno deionizovanou vodou na požadovaný objem tak, aby výsledná koncentrace byla $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Alkalická složka o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byla připravena stejným způsobem s použitím hydrogenfosforečnanu sodného (p.a., Lachema Neratovice, ČR). Obě složky byly uchovávány v zásobních lahvích v chladničce. Vlastní pufr byl následně připraven odlitím kyselé složky a jejím dotitrováním alkalickou složkou na požadované pH.

Dalšími použitými chemikáliemi byly kyselina dusičná (65%, Lach-Ner Neratovice, ČR) o různých koncentracích, jež byly připravovány odpipetováním kyseliny do odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou, a dále methanol (gradient grade, Honeywell Riedel-de Haën, DE).

2.3 Zpracování dat

Měření byla prováděna minimálně ve třech opakováních. Výsledky byly pro další výpočty a statistická zpracování udávány jako mediány opakovaných měření. Hodnoty z koncentrační závislosti byly upraveny metodou lineární regrese.

Mez detekce (*LOD*) a mez stanovitelnosti (*LOQ*) byly vypočteny jako trojnásobek, respektive desetinásobek šumu základní linie nejnižší změřitelné koncentrace a následně přepočteny na koncentraci.

3. Výsledky a diskuze

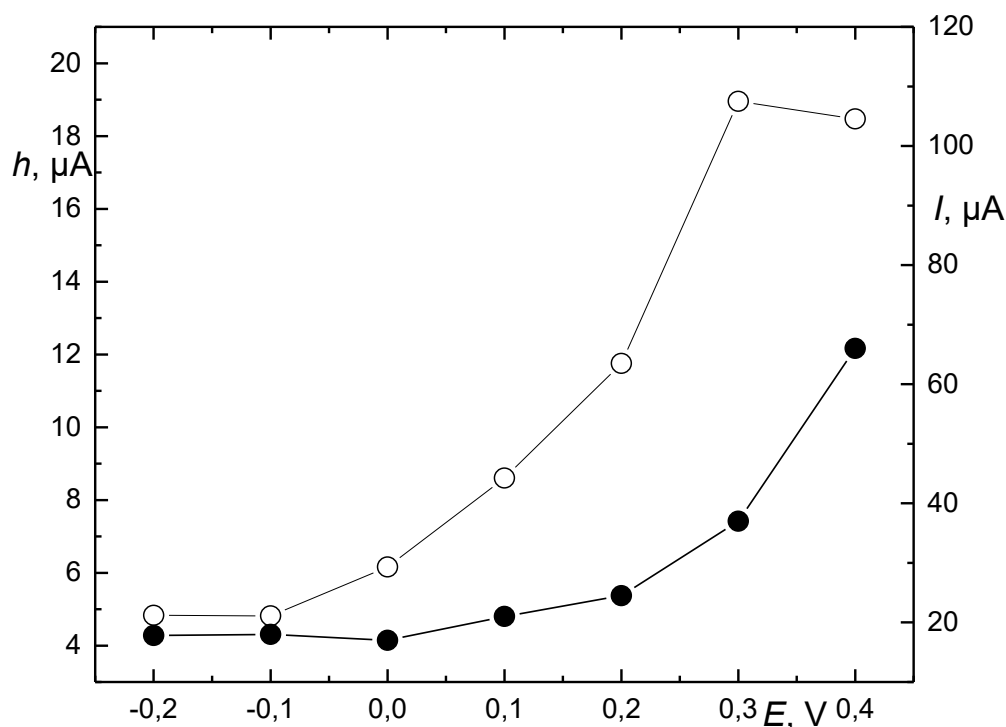
3.1 Zkouška nastavení a podmínek měření

Pro orientaci, jak budou vypadat odezvy vyrobeného detektoru, jsme vyšli z některých parametrů měření uvedených v práci [37]. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 s methanolem v poměru 9:1. Průtoková rychlost byla nastavena na $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Elektroda byla ponořena do zředěné kyseliny dusičné o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a následně opláchnuta deionizovanou vodou. Hmotnost této elektrody byla 102,8 mg a plocha jejího povrchu byla odhadnuta na $4,6 \text{ cm}^2$.

Před nástřikem analytu byla měděná elektroda aktivována: na elektrodu byl v několika cyklech střídavě vkládán potenciál $-0,3 \text{ V}$ po dobu pěti minut a $0,15 \text{ V}$ po dobu patnácti minut, dokud nebylo dosaženo stabilní základní linie. Následně bylo provedeno několika zkušebních nástřiků, při nastavení potenciálu na $0,15 \text{ V}$, během kterých bylo ověřeno, že detektor poskytuje v přítomnosti tyrosinu signál. Tento potenciál byl zvolen na základě údajů v práci [37], ve které byl používán jako detekční pro stanovení glycinu, valinu a isoleucinu.

V dalším kroku bylo třeba zjistit, jaký je optimální potenciál pro stanovení tyrosinu na námi vyrobeném detektoru. Byl naměřen hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v rozsahu potenciálů od $-0,2 \text{ V}$ do $0,4 \text{ V}$ (obr. 3.1). Na obrázku vidíme, že proudové pozadí elektrody je poměrně velké, v rozsahu potenciálů $-0,2 \text{ V}$ až $0,2 \text{ V}$ však vcelku stabilní. Ke strmému nárůstu dochází od hodnoty potenciálu $0,3 \text{ V}$. Vlna odpovídající odezvě tyrosinu je značně posunuta do kladných potenciálů, což pravděpodobně souvisí s potenciálovým spádem elektrody. Jako optimální se jeví potenciál $0,3 \text{ V}$, při kterém je signál tyrosinu na maximu.



Obr. 3.1 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (○), proud pozadí (●). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .

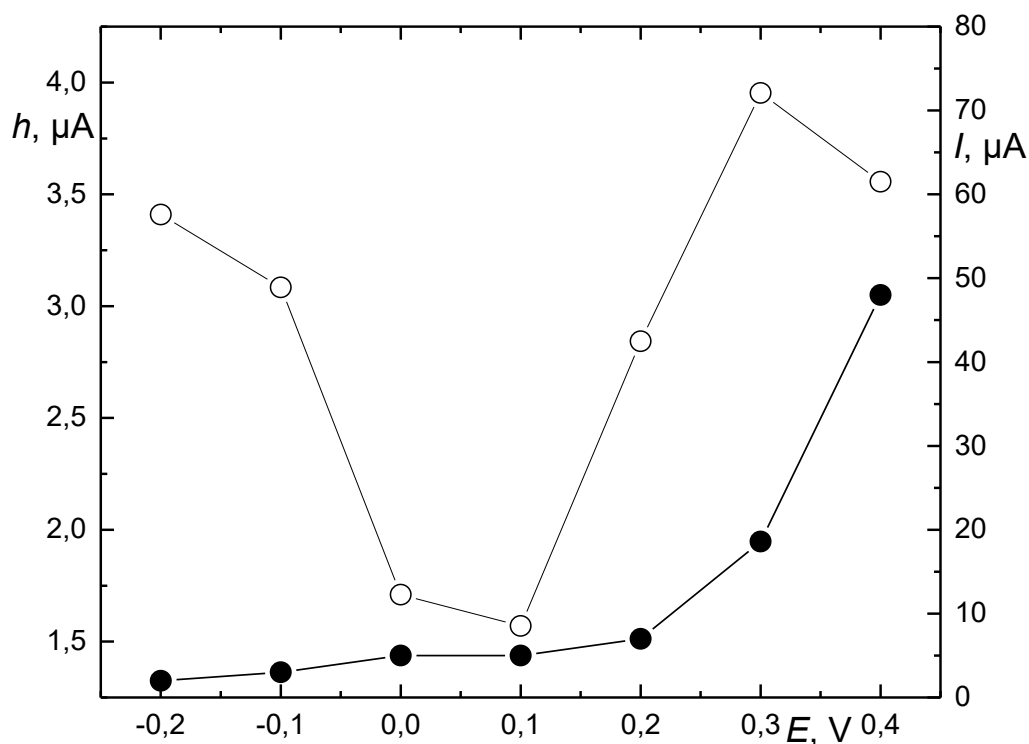
3.1.1 Aktivace měděné elektrody v koncentrované HNO_3

Vycházeli jsme z předpokladu, že aktivací v koncentrovanější kyselině dusičné by mohlo dojít k úplnějšímu očištění povrchu elektrody od vrstvy oxidů a tím ke zvýšení proudové odezvy na tyrosin. K aktivaci byla proto v tomto případě použita kyselina dusičná o koncentraci $5,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a následně byla elektroda opláchnuta deionizovanou vodou. Došlo však k celkovému zvýšení pozadí a pro ustálení odezvy elektrody bylo potřeba více polarizačních cyklů než u elektrod aktivovaných ve zředěné kyselině dusičné o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Píky analytu měly asi poloviční výšku a bylo těžší je odečíst kvůli vysokému šumu. Pro další elektrody tedy byla již používána pouze kyselina dusičná o koncentraci $2,0 \cdot 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

3.1.2 Změna kolony a pH mobilní fáze

Hodnota pH 6,8, která je uvedena v práci [37], je kompromisem mezi hodnotami vhodnými pro silikagelové kolony a pro komplexační reakci měďnatých iontů s aminokyselinami. V práci [36] je však uvedeno, že reakce probíhá v oblasti pH 6-11. V další části práce bylo testováno, jaký vliv na stanovení bude mít zásaditější prostředí. Byl použit fosfátový pufr o pH 8 a kolona Gemini® C-18, 150 × 4,6 mm, 5 μm, která je vhodná i pro zásaditá pH mobilní fáze.

Byl naměřen hydrodynamický voltamogram (obr. 3.2). Jak je vidět, podařilo se snížit pozadí detektoru, avšak na tyrosin poskytoval jen malou odezvu. Pro další měření již tedy byla používána jen původní kolona Purospher® RP-18, 125 × 4 mm, 5 μm a pH elektrolytu 6,8.



Obr. 3.2 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (○), proud pozadí (●). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl.

3.2 Vliv velikosti elektrody na výšku píku

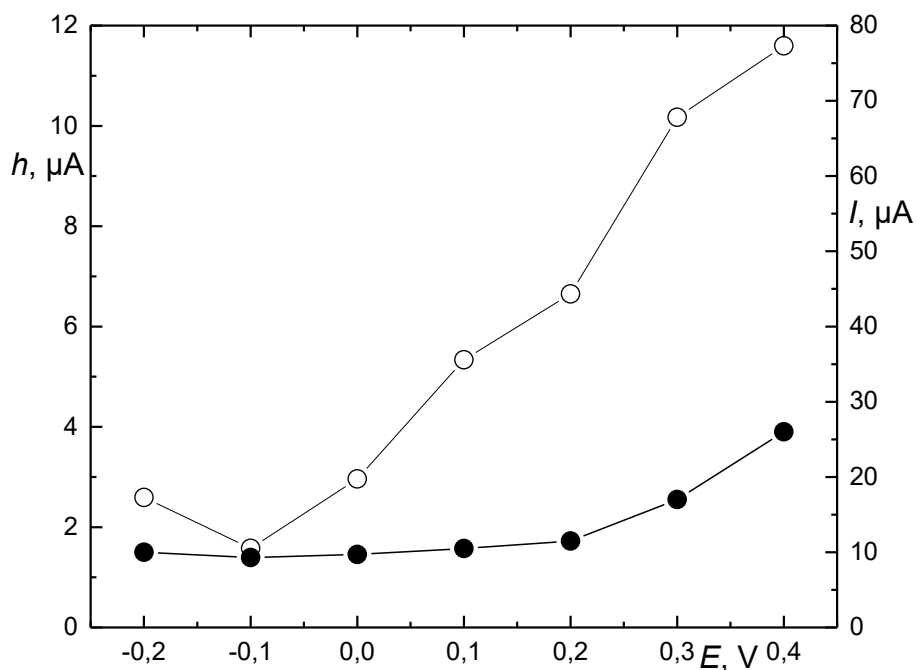
Bylo třeba zjistit, jaký vliv má hmotnost, respektive povrch, elektrody na velikost odezvy detektoru na tyrosin. Pro tento účel byly použity čtyři elektrody, jejichž parametry jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1 Parametry měděných elektrod použitých k naměření hydrodynamických voltamogramů

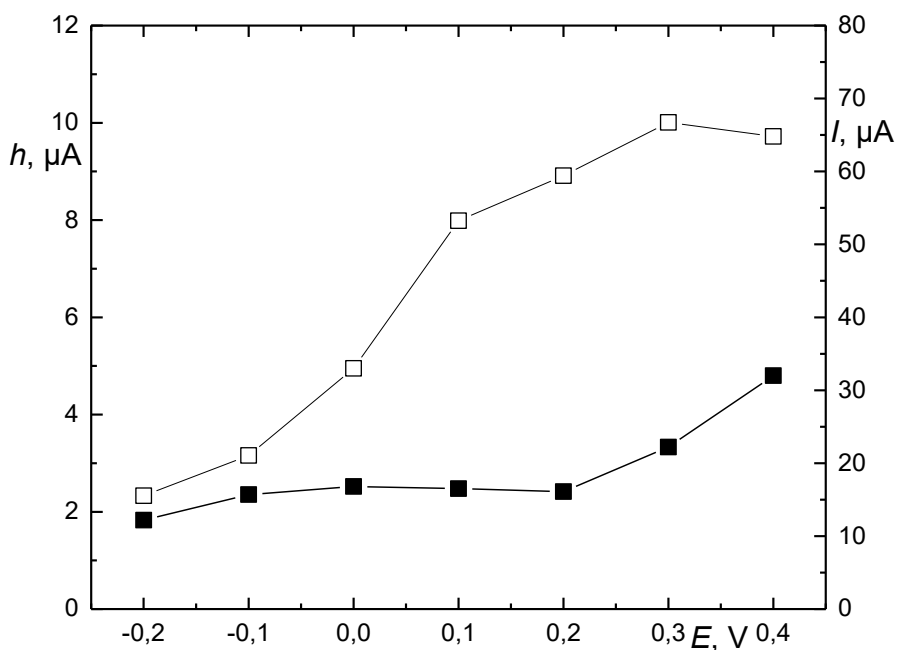
označení elektrody	hmotnost elektrody [mg]	odhadnutý povrch elektrody [cm ²]
E1	102,8	4,6
E2	86,6	3,9
E3	68,3	3,1
E4	43,4	1,9

Před samotným měřením hydrodynamických voltamogramů byla každá elektroda v několika cyklech aktivována vždy 10 minut při potenciálu -0,3 V a 10 minut při potenciálu 0,2 V, tak dlouho, dokud nebylo dosaženo stabilní základní linie s minimálním šumem. Podmínky aktivace byly oproti zkušebnímu měření, kde bylo použito cyklování 5 minut při potenciálu -0,3 V a 15 minut při potenciálu 0,15 V, pozměněny. Nový způsob se ukázal oproti původnímu jako efektivnější. Ustálené základní linie bylo dosaženo rychleji, a přestože se o něco snížila výška píku tyrosinu, podařilo výrazně snížit pozadí.

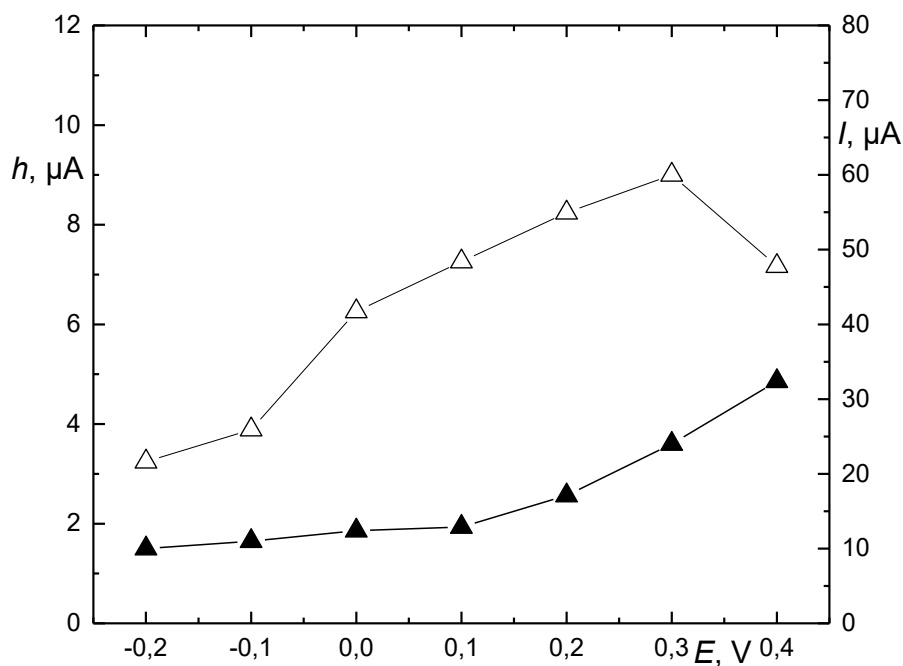
Všechny hydrodynamické voltamogramy byly naměřeny za stejných podmínek. Mobilní fáze obsahovala 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu. Dávkován byl tyrosin o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dávkovací smyčkou o objemu 20 μl . Proměřeny byly potenciály v rozsahu od -0,2 V do 0,4 V. Hydrodynamický voltamogram naměřený s elektrodou E1 můžeme vidět na obr. 3.3, elektrodou E2 na obr. 3.4, E3 na obr. 3.5. a E4 na obr. 3.6.



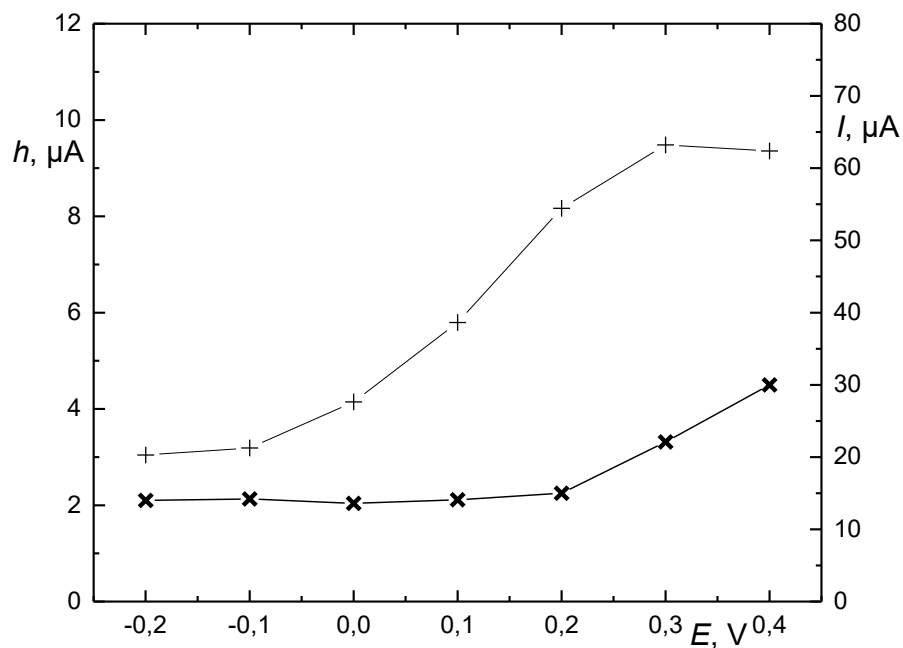
Obr. 3.3 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (○), proud pozadí (●). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl . Měřeno elektrodou E1.



Obr. 3.4 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (□), proud pozadí (■). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl . Měřeno elektrodou E2.



Obr. 3.5 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (Δ), proud pozadí (\blacktriangle). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl . Měřeno elektrodou E3.



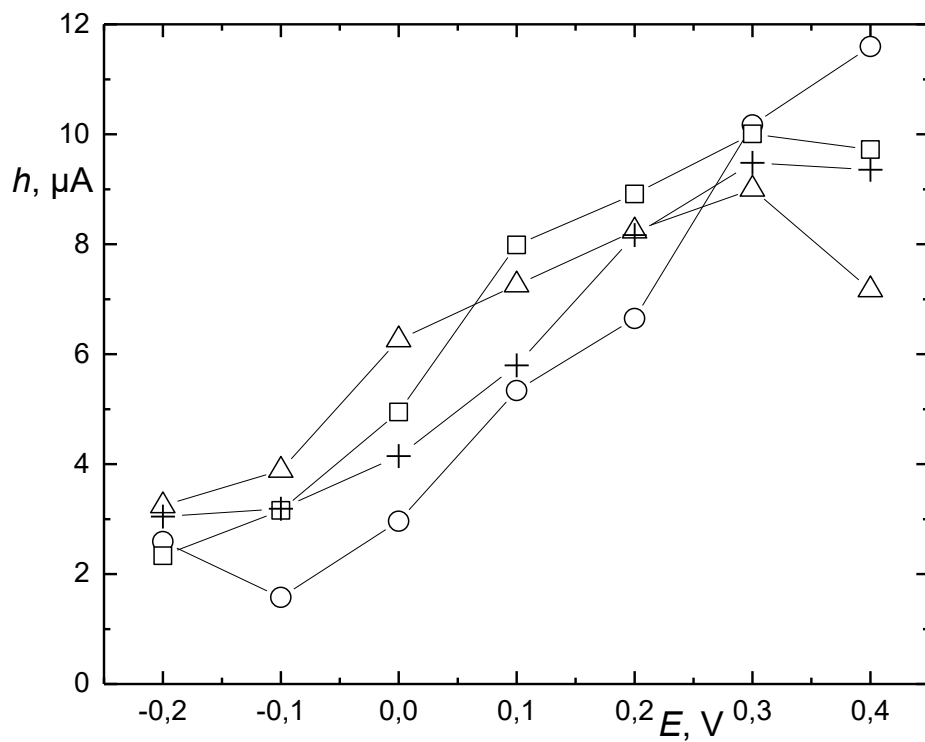
Obr. 3.6 Hydrodynamický voltamogram tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výška píků (+), proud pozadí (\times). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl . Měřeno elektrodou E4.

Na všech naměřených hydrodynamických voltamogramech můžeme pozorovat obdobný průběh. Velikost pozadí je poměrně stabilní v rozsahu potenciálů od -0,2 V do 0,2 V, při hodnotě 0,3 V se pozadí začíná zvyšovat. Stejně jako u zkušebního hydrodynamického voltamogramu (obr. 3.1.) je zjevné, že optimálním potenciálem pro stanovení tyrosinu je 0,3 V. Při tomto potenciálu dochází k nejvyšší proudové odezvě, přičemž hodnota pozadí ještě nedosahuje hodnot, které by mohly zkreslit získané výsledky.

Porovnáme-li výšky píků tyrosinu naměřené na všech čtyřech elektrodách (obr. 3.7), zjistíme, že dosahují obdobných hodnot. Tento fakt by napovídal, že elektrochemická reakce probíhá ve všech případech se stejným stupněm konverze.

S využitím Faradayova zákona byla vypočtena teoretická hodnota prošlého náboje. Počítáno bylo s koncentrací tyrosinu $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ dávkované v objemu 20 μl , předpokládanou výměnou jednoho elektronu a Faradayovou konstantou. Tato hodnota byla porovnána s hodnotou odpovídající ploše píku tyrosinu naměřeném na elektrodě E4 při potenciálu 0,3 V. Bylo zjištěno, že reálná hodnota prošlého náboje představuje 6,9 % hodnoty teoretické, z čehož vyplývá, že reakce neprobíhá kvantitativně.

Závěrem této kapitoly tedy můžeme říci, že pro další měření je dostačující nejmenší elektroda (E4), jelikož větší elektrody nemají na velikost odezvy detektoru na tyrosin vliv, a dále také, že detektor je amperometrický, nikoli coulometrický.

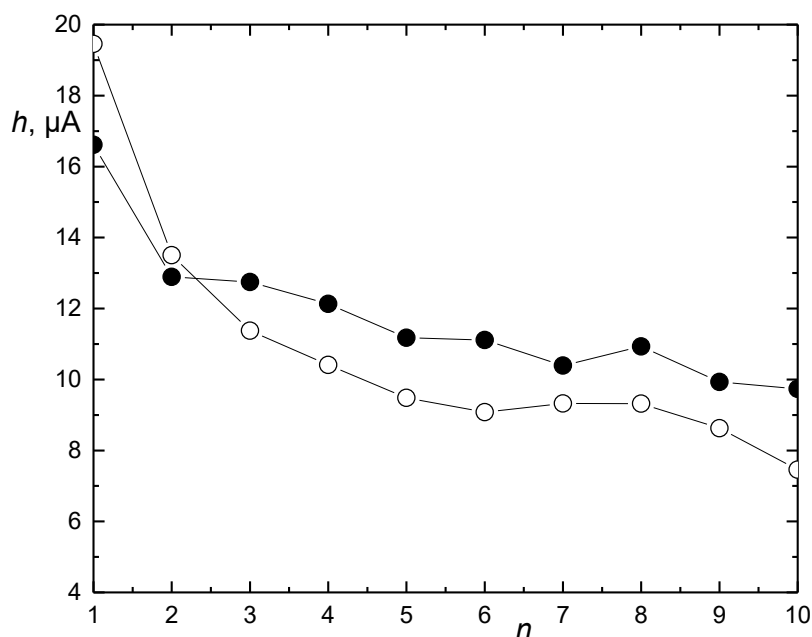


Obr. 3.7 Porovnání výšky píků tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ s použitím elektrody E1 (○), E2 (□), E3 (Δ) a E4 (+). Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .

3.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost je důležitým parametrem při hodnocení kvality analytické metody. Po zjištění optimálního potenciálu pro stanovení tyrosinu, bylo třeba zjistit míru opakovatelnosti po sobě jdoucích měření.

Na obrázku 3.8 vidíme dvě série deseti po sobě jdoucích měření tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při potenciálu 0,3 V. První série, značena plnými symboly (●), byla naměřena po počáteční aktivaci – 10 minut při potenciálu -0,3 V a 10 minut při potenciálu 0,2 V v několika cyklech, až do ustálení základní linie. Následně byl na 10 minut nastaven potenciál -0,3 V, a poté byla naměřena druhá série, značena prázdnými symboly (○). Jak je z obrázku patrné, po prvním měření vždy došlo k prudkému poklesu signálu, který byl pravděpodobně způsoben stabilizací povrchu elektrody. První měření po aktivaci tedy nebyla při vyhodnocování uvažována. Hodnotíme-li druhé až desáté měření, v případě první série byl pokles signálu 24,5 % a relativní směrodatná odchylka 10,2 %, u druhé série byl potom pokles dokonce 44,8 % a relativní směrodatná odchylka 17,8 %.

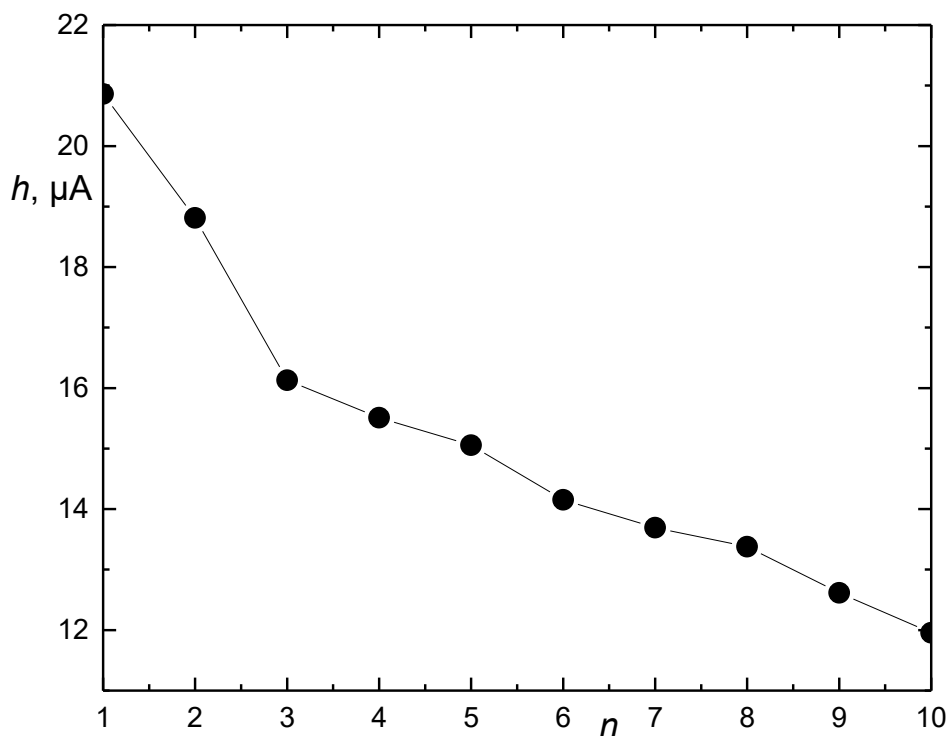


Obr. 3.8 Změna výšky píku tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při deseti opakovaných měřeních po počáteční aktivaci (●), po 10 min na -0,3 V (○). Měřeno při potenciálu 0,3 V. Průtok $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 µl.

3.3.1 Opakovatelnost s meziaktivací

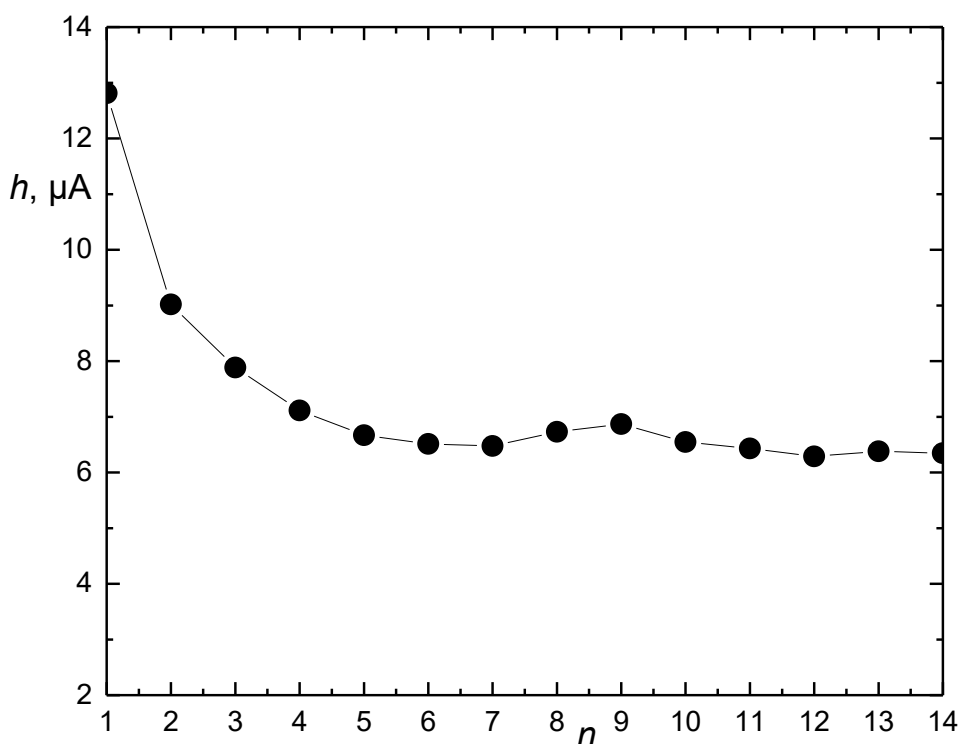
Vzhledem k tomu, že opakovaná měření ke stabilizaci signálu nevedla a docházelo k jeho stálému poklesu, bylo třeba zvážit možné způsoby meziaktivace elektrody.

Prvním takovým pokusem bylo vložení půlminutového aktivačního kroku na potenciálu -0,3 V mezi každé následující měření. Vycházeli jsme z faktu, že přepnutí do záporného potenciálu dokáže dočasně zvýšit signál, což je patrné i z prvního bodu druhé měřicí série na obr. 3.8. Tato metoda se však neukázala jako účinná. Na obrázku 3.9 můžeme vidět, že mezi prvním a třetím měřením byl zaznamenán velmi prudký pokles signálu, v následujících měřeních se pokles sice zpomalil, ale stále byl dost strmý, tudíž k ustálení nedošlo.



Obr. 3.9 Změna výšky píku tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při deseti opakovaných měřeních s meziaktivací 30 s na -0,3 V mezi každým měřením. Měřeno při potenciálu 0,3 V. Průtok $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.

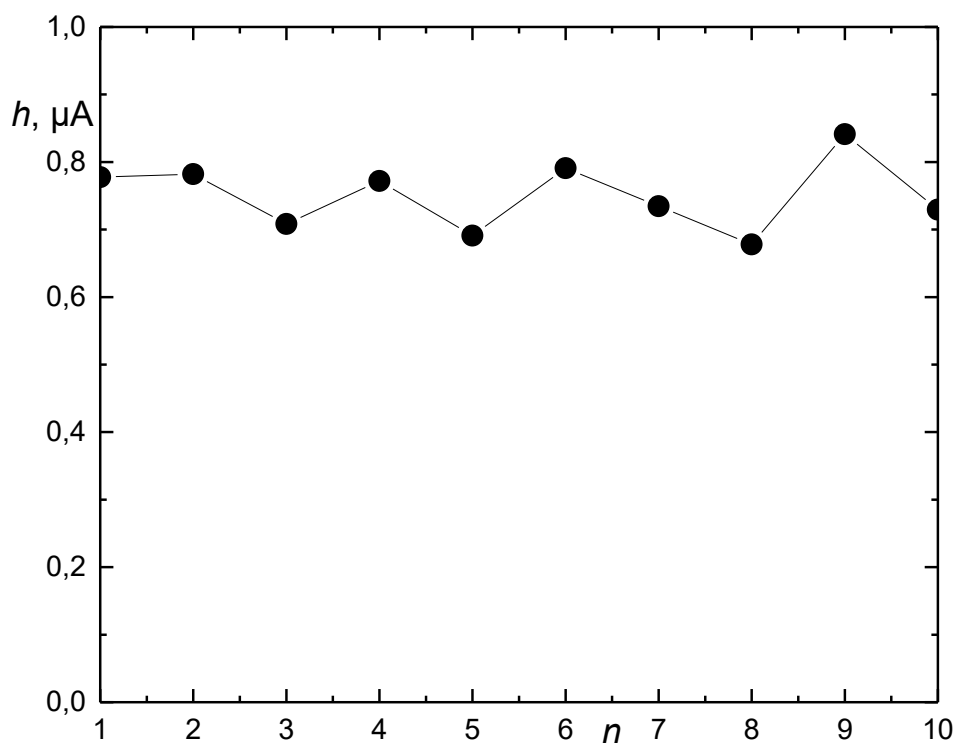
Úspěchu bylo dosaženo dalším pokusem. Po počáteční aktivaci byl před každé další měření vložen meziaktivační krok – půl minuty při potenciálu -0,3 V a minuta při potenciálu 0,2 V. Jak můžeme vidět na obrázku 3.9, v průběhu prvních čtyř měření došlo k ustálení signálu, následujících deset měření (5-14) poskytovalo stabilní signál. Statistickým vyhodnocením těchto deset měření bylo zjištěno, že jejich relativní směrodatná odchylka je 2,8 %, což se dá považovat za vyhovující míru opakovatelnosti.



Obr. 3.9 Změna výšky píku tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při deseti opakovaných měřeních s meziaktivací 30 s na -0,3 V a 1 min na 0,2 V mezi každým měřením. Měřeno při potenciálu 0,3 V. Průtok $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .

3.3.2 Opakovatelnost při nižší koncentraci

Vyzkoušena byla také opakovatelnost měření při nižší koncentraci tyrosinu. Zásobní roztok byl naředěn na výslednou koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zajímavým zjištěním bylo, že po snížení koncentrace není třeba vkládat meziaktivační krok. Na obrázku 3.10 vidíme deset po sobě jdoucích měření, jejichž relativní směrodatná odchylka je 6,8 %.



Obr. 3.10 Změna výšky píku tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ při deseti opakovaných měřeních. Měřeno při potenciálu 0,3 V. Průtok $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .

3.4 Koncentrační závislost tyrosinu

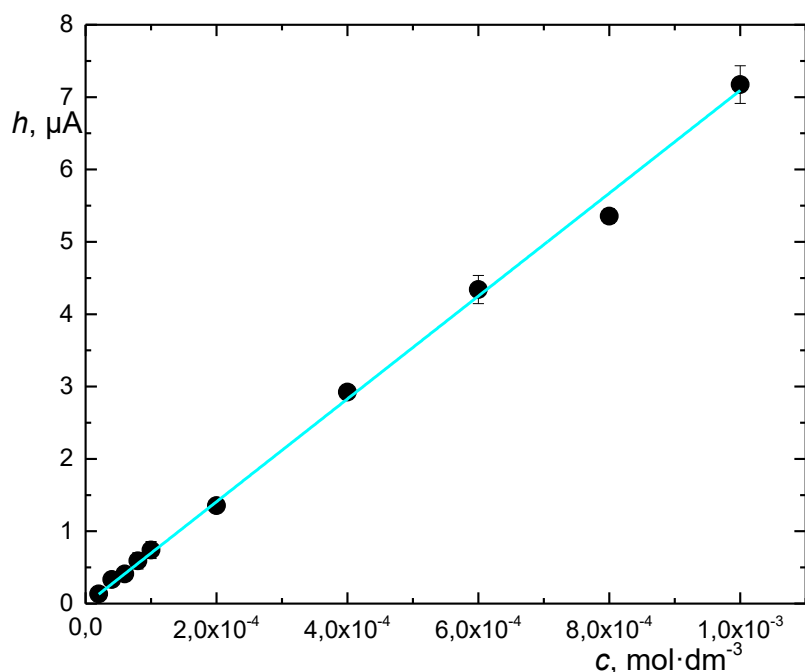
Nakonec byla ověřena linearita proudové odezvy v závislosti na koncentraci tyrosinu. Byly proměřeny kalibrační roztoky v rozsahu koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Všechny křivky byly naměřeny za stejných podmínek. Mobilní fáze obsahovala 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu. Dávkováno bylo smyčkou o objemu 20 μl a potenciál byl nastaven na 0,3 V. V koncentračním rozmezí od $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl mezi opakovanými měřeními každé koncentrace vkládán meziaktivační krok - 30 s na -0,3 V a 1 min na 0,2 V. Při měření koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ již byl tento krok vynechán.

Koncentrační závislost z výšek píků tyrosinu je vidět na obrázku 3.11, pro celý koncentrační rozsah, a na obrázku 3.12 pro koncentrace od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Na obrázku 3.13 jsou zobrazeny vybrané křivky provedených měření v celém použitém koncentračním rozsahu. Na obrázku 3.14 jsou potom detailněji vidět vybrané křivky naměřené v rozsahu koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Parametry získaných přímek jsou uvedeny v tabulce 3.2, přičemž hodnoty jsou rozděleny pro jednotlivé úseky. Jejich linearitu potvrzují nejen hodnoty korelačních koeficientů (R), ale i vzájemná shoda směrnic v různých úsecích koncentračních závislostí. Velikost úseků je zanedbatelná.

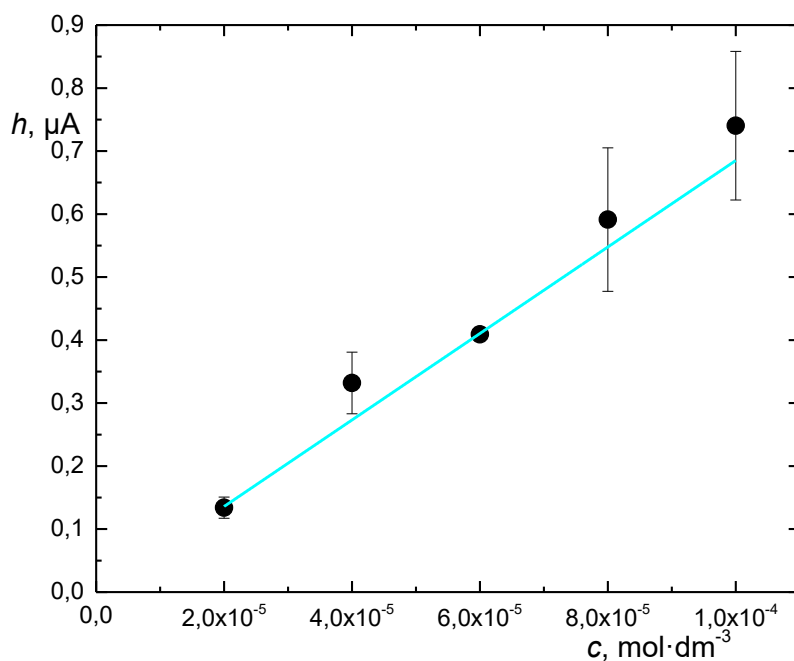
Důležitými údaji o citlivosti metody jsou meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ). Jejich hodnoty byly vypočteny jako trojnásobek, respektive desetinásobek šumu základní linie nejnížší měřené koncentrace, tedy $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, a následně přepočteny na koncentraci. Hodnota LOD je $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a LOQ $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Tab. 3.2 Parametry kalibrační závislosti při různém rozsahu koncentrací

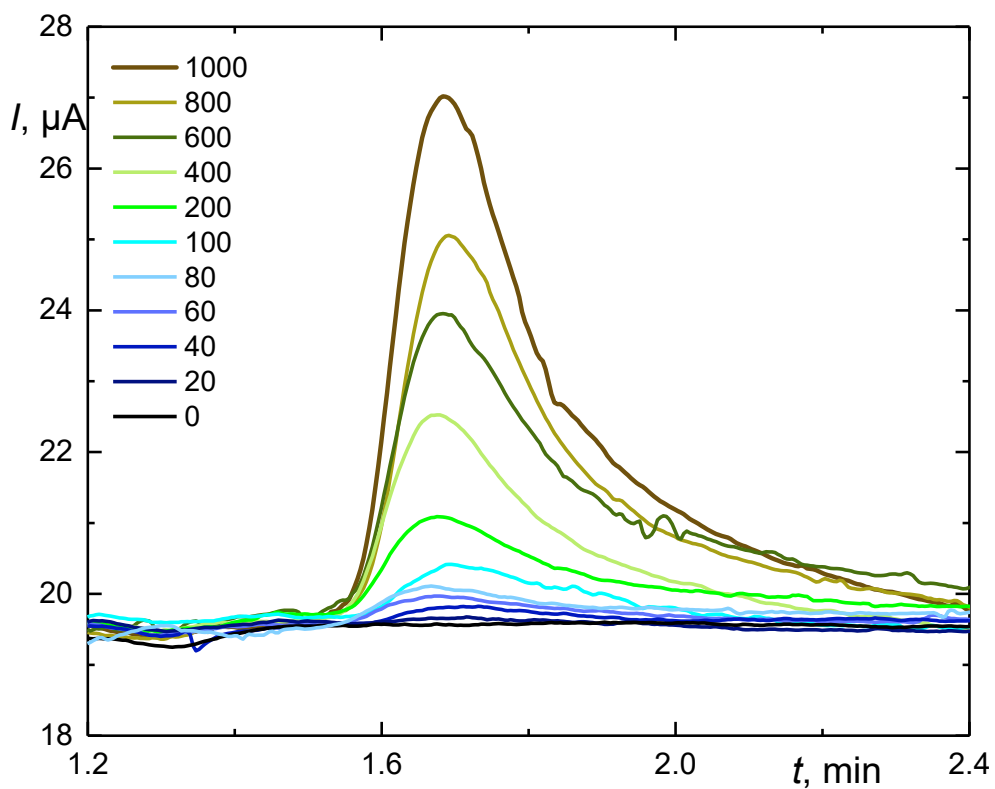
rozsah koncentrací $\cdot 10^3$ [$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$]	směrnice [$\text{mA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$]	úsek [μA]	R
1 – 0,02	$7,11 \pm 0,12$	$-0,013 \pm 0,013$	0,9977
1 – 0,1	$6,92 \pm 0,31$	$0,079 \pm 0,128$	0,9920
0,1 – 0,02	$6,86 \pm 0,35$	$-0,001 \pm 0,019$	0,9898



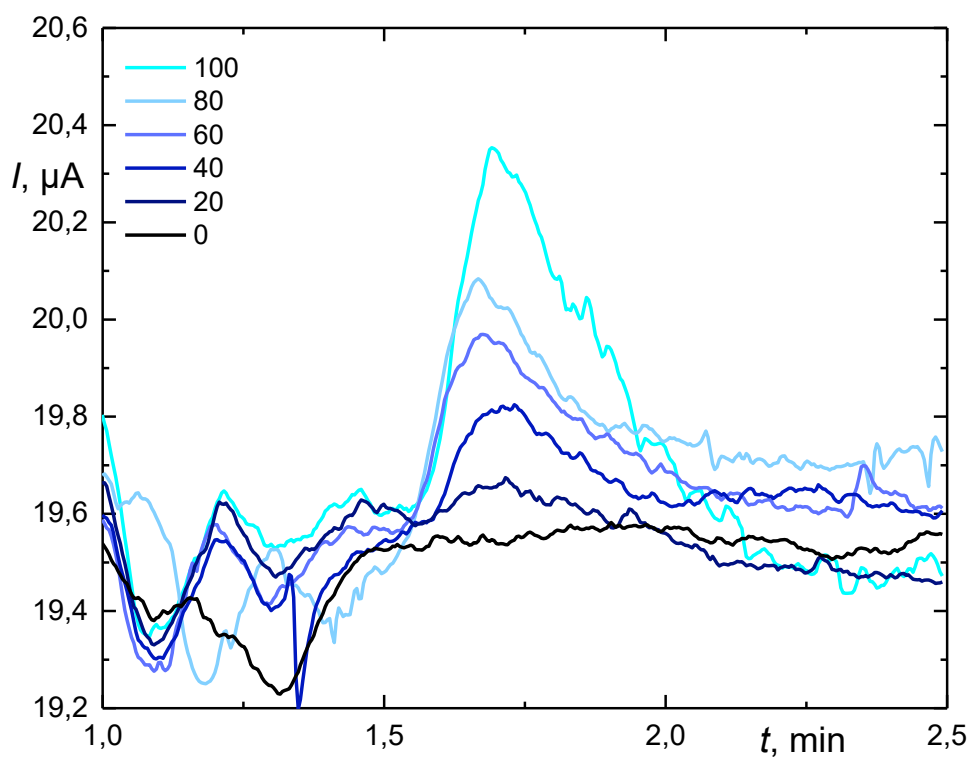
Obr. 3.11 Koncentrační závislost tyrosinu v rozsahu koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .



Obr. 3.12 Koncentrační závislost tyrosinu v rozsahu koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky 20 μl .



Obr. 3.13 Vybrané křivky tyrosinu v rozmezí koncentrací od $1,0\cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ do $2,0\cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v legendě grafu. Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5\cdot 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.



Obr. 3.14 Vybrané křivky tyrosinu v rozmezí koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Koncentrace jsou uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ v legendě grafu. Měřeno při průtoku $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, mobilní fáze – 90 % fosfátového pufru o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 a 10 % methanolu, objem dávkovací smyčky $20 \mu\text{l}$.

4. Závěr

V této práci bylo studováno chování elektrochemického detektoru pro stanovení aminokyselin, s elektrodou vyrobenou z tenkých měděných drátků. Jako modelová látka byl použit tyrosin. Tento výběr byl podmíněn především tím, že jako jeden z mála proteinogenních aminokyselin absorbuje v UV oblasti, tudíž mohl být pro kontrolu použit UV-Vis detektor.

Největším úskalím práce s touto elektrodou byla samotná její aktivace. Jako nejúčinnější způsob se osvědčilo střídavé vkládání potenciálu -0,3 V po dobu 10 minut a 0,2 V po dobu dalších 10 minut, tak dlouho, dokud nebylo dosaženo stabilní základní linie. Kromě elektrochemické aktivace bylo experimentováno také s aktivací chemickou, kdy byla elektroda před připojením k detektoru ponořena do kyseliny dusičné o koncentraci $5,0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, ke zlepšení však nedošlo, efekt byl spíše opačný.

Měřeno bylo v prostředí fosfátový pufr o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 6,8 s methanolem v poměru 9:1. Průtoková rychlost byla nastavena na $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tyto podmínky byly přejaty z práce [37]. Pokusy o změny těchto parametrů nevedly ke zlepšení kvality signálu.

Porovnáním hydrodynamických voltamogramů naměřených na čtyřech různých měděných elektrodách bylo zjištěno, že hmotnost elektrody nemá na výšku signálu tyrosinu vliv. To se jeví jako výhodné, jelikož nedochází ke změně signálu v závislosti na rozpouštění mědi. Dále se však ukázalo, že reálná hodnota prošlého náboje představuje 6,9 % hodnoty teoretické, z čehož vyplývá, že reakce neprobíhá kvantitativně, a detektor je tedy amperometrický.

Jako optimální detekční potenciál byla vyhodnocena hodnota 0,3 V, což je potenciál o něco vyšší, než je uváděna v literatuře. Tento fakt pravděpodobně souvisí s potenciálovým spádem elektrody.

Pro dosažení vyhovující míry opakovatelnosti, při měření tyrosinu o koncentraci $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, bylo po počáteční aktivaci třeba vložit před každé další měření meziaktivační krok – půl minuty při potenciálu -0,3 V a minuta při potenciálu 0,2 V. Po ustálení signálu bylo tímto způsobem naměřeno deset po sobě jdoucích měření

s *RSD* 2,8 %. Dále bylo také zjištěno, že je-li koncentrace tyrosinu desetinová, tedy $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, není třeba meziaktivační krok vkládat.

Nakonec byla ověřena linearita proudové odezvy tyrosinu v závislosti na koncentraci. Proměřen byl rozsah koncentrací od $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Byla zjištěna mez detekce $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $5,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

5. Literatura

1. Kodíček, M., Valentová, O., Hynek R.: *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*, Praha, Vysoká škola chemicko-technologická (2015).
2. Šípal, Z., Anzenbacher, P., Peč, P., Pospíšil, J., Růžička, I.: *Biochemie*, Praha, Státní pedagogické nakladatelství (1992).
3. Karlson, P.: *Základy biochemie*, Praha, Československá akademie věd (1981).
4. Sigma-Aldrich, *Bezpečnostní list: L-Tyrosin*, dostupné z URL: <https://www.sigmaaldrich.com> [cit. 2.7.2020].
5. van Spronsen, F., van Rijn, M., Bekhof, J., Koch, R., Smit, P.: Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 153 (2001).
6. Matthews, E.: An Overview of Phenylalanine and Tyrosine Kinetics in Humans. *Journal of Nutrition* **137**, 1549-1575 (2007).
7. Gatti, R., Giaoi, M.: Liquid chromatographic fluorescence determination of amino acids in plasma and urine after derivatization with phanquinone. *Biomedical Chromatography* **22**, 207–213 (2008).
8. Csapó, J., Albert, C., Lóki, K., Csapó-Kiss, Z.: Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying postcolumn derivatization. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria* **1**, 5–29 (2008).
9. Fu, G. N., He, Y. Z., Wang, L., Wang, X. K.: Determination of amino acids in tobacco samples by capillary electrophoresis/indirect absorbance detection with isolation of the electrolysis compartment and p-Aminobenzoic acid as a background electrolyte. *Analytical Sciences* **22**, 883–887 (2006).
10. Soga, T., Imaizumi, M.: Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis* **22**, 3418–3425 (2001).

11. Culea, M., Stăncuța, S., Suvar, S., Podea, P., Haș, I., Muste, S. : Determination of Amino Acids in Corn Seed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical. Letters* **48**, 37–46 (2015).
12. Trineeva, O. V., Safonova, E. F., Sinkevich, A. V., Slivkin, A. I.: Assay of Amino Acids in Medicinal Plants by TLC (Using Stinging Nettle Leaves and Common Sea Buckthorn Fruits as Examples). *Pharmaceutical Chemistry Journal* **49**, 323–328 (2015).
13. Mohammad, A., Moheman, A., El-Desoky, G. E.: Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: Review of the current state. *Central European Journal of Chemistry* **10**, 731–750 (2012).
14. Barrett, G.: *Chemistry and biochemistry of the amino acids*, Springer Science & Business Media (2012).
15. Spackman, D. H., Stein, W. H., Moore, S.: Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Analytical Chemistry* **30**, 1190–1206 (1958).
16. Malmström, B. G., Leckner, J.: The chemical biology of copper. *Current Opinion in Chemical Biology* **2**, 286–292 (1998).
17. Kubíčková, A., Kubíček, V., Coufal, P.: UV-VIS detection of amino acids in liquid chromatography: Online post-column solid-state derivatization with Cu(II) ions. *Journal of Separation Science* **34**, 3131–3135 (2011).
18. Levin, S., Grushka, E.: Reversed-Phase Liquid Chromatographic Separation of Amino Acids with Aqueous Mobile Phases Containing Copper Ions and Alkylsulfonates. *Analytical Chemistry* **57**, 1830-1835 (1985).
19. Muramoto, K., Kamiya, H.: Analyses of Dansyl and Dabsyl Amino Acids by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries* **51**, 817–824 (1985).
20. Lee, S. H., Oh, T. S., Lee, Y. C.: Optical Resolution of Dabsyl Amino Acids in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **11**, 411–415 (1990).

21. González-Castro, M. J., López-Hernández, J., Simal-Lozano, J., Oruña-Concha, M. J.: Determination of Amino Acids in Green Beans by Derivatization with Phenylisothiocyanate and High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Journal of chromatographic science* **35**, 181–185 (1997).
22. Fekkes, D., van Dalen, A., Edelman, M., Voskuilen, A.: Validation of the determination of amino acids in plasma by high-performance liquid chromatography using automated pre-column derivatization with o-phthaldialdehyde. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **669**, 177–186 (1995).
23. Jaworska, M., Stanczyk, M., Wilk, M., Kłaczko, G., Anuszevska, E., Barzał, J., Rzepecki, P.: New approach for amino acid profiling in human plasma by selective fluorescence derivatization. *Amino Acids* **43**, 1653–1661 (2012).
24. Pappa-Louisi, A., Agrafiotou, P., Sotiropoulos, S.: Advances in Liquid Chromatographic and Voltammetric Analysis of Underivatized Amino Acids. *Current Organic Chemistry* **14**, 2235–2246 (2010).
25. Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M.: Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. *Journal of Chromatography A* **870**, 245–254 (2000).
26. Petritis, K., Gillaizeau, I., Elfakir, C., Dreux, M., Petit, A., Bongibault, N., Luijten, W.: Evaporative light scattering detection for in-line monitoring of stopped-flow liquid chromatography-nuclear magnetic resonance analysis of compounds with weak or no chromophore groups. *Journal of Separation Science* **25**, 593–600 (2002).
27. Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M.: Determination of 20 underivatized proteinic amino acids by ion-pairing chromatography and pneumatically assisted electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **855**, 191–202 (1999).

28. Petritis, K., Chaimbault, P., Elfakir, C., Dreux, M.: Parameter optimization for the analysis of underivatized protein amino acids by liquid chromatography and ionspray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **896**, 253–263 (2000).
29. Herzog, G., Arrigan, D. W. M.: Electrochemical strategies for the label-free detection of amino acids, peptides and proteins. *Analyst* **132**, 615–632 (2007).
30. Possari, R., Carvalhal, R. F., Mendes, R. K., Kubota, L. T.: Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold. *Analytica chimica acta* **575**, 172–179 (2006).
31. Zhao, C., Zhang, J., Song, J.: Determination of L-cysteine in amino acid mixture and human urine by flow-injection analysis with a biamperometric detector. *Analytical Biochemistry* **297**, 170–176 (2001).
32. Loscombe, C. R., Cox, G. B., Dalziel, J. A. W.: Application of a copper electrode as a detector for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **166**, 403–410 (1978).
33. Štulík, K., Pacáková, V., Le, K., Hennisen, B.: Amperometric flow detection with a copper working electrode-response mechanism and application to various compounds. *Talanta* **35**, 455–460 (1988).
34. El-Tantawy, Y. A., Al-Kharafi, F. M., Katrib, A.: Nature and mechanism of anodic film formation on Cu in alkaline phosphate media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **125**, 321–331 (1981).
35. Strehblow, H., Titze, B.: The investigation of the passive behaviour of copper in weakly acid and alkaline solutions and the examination of the passive film by esca and iss. *Electrochimica Acta* **25**, 839–850 (1980).
36. Kok, W. Th., Hanekamp, H. B., Bos, P.: Amperometric detection of amino acids with a passivated copper electrode. *Analytica Chimica Acta* **142**, 31–45 (1982).
37. Štulík, K., Pacáková, V., Weingart, M., Podolák, M.: Operation parameters of voltammetric high-performance liquid chromatographic detectors with copper electrodes and application to a determination of some fodder biofactors. *Journal of Chromatography* **367**, 311–321 (1986).

38. Kok, W. Th., Groenendijk, G., Brinkman, U. A. Th., Frei, R. W.: Determination of oxalic acid in biological matrices by liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography* **315**, 271-278 (1984).
39. Alexander, P. W., Haddad, P. R., Trojanowicz, M.: Potentiometric Flow-Injection Determination of Copper Complexing Inorganic Anions with a Copper Wire Indicator Electrode. *Analytical Chemistry* **56**, 2417–2422 (1984).
40. Kok, W. Th., Brinkman, U. A. Th., Frei, R. W.: Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode. *Journal of Chromatography* **256**, 17–26 (1983).
41. Pecková, K., Mocko, V., Opekar, F., Swain, G. M., Zima, J., Barek, J.: Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu. *Chemické listy* **100**, 124–132 (2006).
42. Štulík, K., Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*, Praha, Nakladatelství technické literatury (1989).